Aus der Kinderklinik der Universität Tübingen
Ehemaliger Direktor: Professor Dr. K. Betke

Untersuchungen zur zytologischen Darstellung von adultem und fetalem Hämoglobin in Erythrozyten von Blutausstrichen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hansmartin Killguss
aus Freudenstadt

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0108

Aus der Kinderklinik der Universität Tübingen
Ehemaliger Direktor: Professor Dr. K. Betke

Untersuchungen zur zytologischen Darstellung von adultem und fetalem Hämoglobin in Erythrozyten von Blutausstrichen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hansmartin Killguss
aus Freudenstadt

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan : Professor Dr. W. Graumann
1. Berichterstatter : Dozent Dr. E. Kleihauer
2. Berichterstatter : Professor Dr. K. Betke

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung ... 1

2. Eigene Untersuchungen

2.1 Material und Methoden ... 5

2.11 Die Objektträgermethode ... 5

2.12 Versuche zur Objektträgermethode ... 6

2.13 Versuche mit Vitalfarbstoffen ... 7

2.14 Veränderungen der Membraneigenschaften ... 8

2.15 Veränderung der Zustandsform des intrazellulären Hämoglobins ... 9

2.16 Modellversuche ...1o

2.2 Ergebnisse (Abbildungen und Tabellen) ...15

3. Diskussion ...29

4. Zusammenfassung ...38

5. Literaturverzeichnis ...4o

1. Einleitung

Blutfarbstoff Erwachsener ist nicht identisch mit fetalem Hämoglobin. Körber stellte dies zum ersten Mal im Jahre 1866 an der größeren Resistenz von Plazentarblut gegen Natronlauge fest und legte damit den Grundstein zu einer neuen Forschungsrichtung der Hämatologie.

In der Folgezeit gab es viele neue Befunde, die zur Differenzierung dieser beiden wichtigen Hämoglobintypen beitrugen und die sie in ihrer Struktur und ihren Eigenschaften charakterisierten. [Übersicht bei BETKE (1) und KLEIHAUER (25).] Grundlage für die physikalisch-chemischen Unterschiede bildet die verschiedene Struktur der Globine. Der Globinanteil des Hämoglobinmoleküls besteht aus vier Polypeptidketten, von denen je zwei identisch sind (37). Gemeinsam sind allen normalen menschlichen Hämoglobinen mit Ausnahme des embryonalen Blutfarbstoffs Hb Gower 1 zwei gleiche α-Ketten, während die Unterschiede im restlichen Kettenpaar bestehen. Bei der Hauptfraktion des adulten Blutfarbstoffs, dem HbA_1, werden sie als β-Ketten, beim fetalen Hämoglobin, dem HbF, als γ-Ketten bezeichnet. HbF selbst läßt sich wieder in zwei weitere Fraktionen auftrennen. Das HbF_I als Minorfraktion unterscheidet sich vom HbF_{II} durch eine Acetylgruppe am N-terminalen Ende der γ-Kette, während sie in ihren Eigenschaften identisch sind (45). Die Aufklärung der Aminosäurensequenz der α-, β-, und γ-Kette gelang durch BRAUNITZER et al., HILL et all. und SCHROEDER et al.(9,18,44) in den letzten zehn Jahren. Sie fanden für die α-Kette 141, für die β- und γ-Kette je 146 Aminosäuren, sodaß beide Hämoglobine aus insgesamt 574 Aminosäuren bestehen und damit ein Molekulargewicht von 64000 ergeben.

Ein der wichtigsten Eigenschaften des fetalen Hämoglobins ist die oben erwähnte größere Alkalistabilität. Sie dient als Grundlage für einen qualitativen und quantitativen Nachweis dieses Blutfarbstoffes, bei dem entweder das alkalilabile Denaturierungsprodukt ausgefällt (42) oder der Denaturierungsvorgang optisch registriert wird (10).

Daneben gibt es aber noch eine ganze Reihe anderer Eigenschaften,

durch die sich adulter und fetaler Blutfarbstoff unterscheiden lassen :

So ist fetales Hämoglobin z.B. spektrophotometrisch durch eine Tryptophanbande im UV-Bereich bei 289,9 nm charakterisiert (2o).

Neben einer doppelt so hohen Stabilität gegen Säure (8,25) zeichnet sich HbF weiter durch eine nur halb so große Beständigkeit gegen Hitze aus (4).

Die Dissoziationsfähigkeit von HbF in Untereinheiten ist bedeutend geringer als bei HbA. Sie erreicht erst bei niedrigeren pH-Werten und längerer Zeit dasselbe Ausmaß (39).

In Salzlösungen gleicher Konzentration ist HbF besser löslich als HbA, d.h., es ist schwerer ausfällbar (38).

Die Oxydation von HbF zu Methämoglobin durch Kaliumferrizyanid und Natriumnitrit erfolgt doppelt so rasch wie bei HbA (5,6,28). Auf dieser Eigenart des fetalen Hämoglobins beruhen im wesentlichen die im Säuglingsalter häufiger auftretenden Methämoglobinämien, wie sie besonders durch Nitrat und aromatische Amine hervorgerufen werden [Übersicht bei KLEIHAUER (25)].

Weiterhin lassen sich HbF und HbA durch verschiedene elektrophoretische und chromatographische Methoden voneinander unterscheiden und erfassen [Übersicht bei HUISMAN (19)].

Die Methoden, die auf den genannten Eigenschaften von HbF und HbA beruhen, ergeben zwar eine quantitative und qualitative Erfassung dieser beiden Hämoglobintypen, sagen aber nichts über ihre Verteilung im einzelnen Erythrozyten aus. Dies wurde erstmals ermöglicht durch die von BETKE und KLEIHAUER (3,27) entwickelte Objektträgermethode, der die Beobachtung von SCHENK (43) zugrunde liegt, daß das Globin des Nabelschnurblutes durch Salzsäurepepsin langsamer verdaut wird als das des Erwachsenenblutes. Behandelt man nun fixierte Blutausstriche mit Salzsäurepepsin, so zeigt sich, daß nicht das Pepsin, sondern nur die Wasserstoffionenkonzentration der Inkubationslösung für die unterschiedliche Elution von HbF und HbA aus den Zellen ausschlaggebend ist (27). Diese Versuche bilden die Grundlage der Objektträgermethode zur Differenzierung von HbF und HbA in Erythrozyten, die heute in vielen Laboratorien bei verschiedenen Fragestellungen Anwendung findet.

Sie erbrachte folgende neuen Erkenntnisse und Anwendungsmöglichkeiten :

HbF und HbA sind ungleichförmig über die Erythrozytenpopulationen von Feten und Neugeborenen verteilt. Daraus folgt:

a) Es besteht keine Organspezifität für die Bildung von HbF und HbA, d.h., sowohl während der hepatolienalen als auch der medullären Blutbildungsperiode können beide Hämoglobine gebildet werden.
b) Erythrozytenvorstufen sind imstande, nebeneinander in der selben Zelle Hämoglobine unterschiedlicher Eiweißstruktur zu synthetisieren.

Beides wird bestätigt durch das Vorkommen einer Erbkrankheit, der hereditären Persistenz von HbF, wo bei Erwachsenen in allen Erythrozyten neben HbA auch HbF nachgewiesen werden kann.

Die Methode, die mit relativ geringem Aufwand durchzuführen ist, hat eine Reihe wichtiger Anwendungsmöglichkeiten (26) :

1. Zum Nachweis fetaler Erythrozyten im mütterlichen Blut (Fetomaternale Transfusion) :
   a) bei Schwangeren, Gebährenden und frisch Entbundenen bei Rh-Konstellation im Hinblick auf eine Sensibilisierung;
   b) bei Blutungsschock und posthämorrhagischer Anämie des Neugeborenen, z.B. nach Plazenta praevia-Blutung oder massiver fetomaternaler Transfusion.
2. Zum Nachweis mütterlicher Erythrozyten im kindlichen Blut (Maternofetale Transfusion).
3. Zur Diagnostik von Blutkrankheiten mit Vermehrung von HbF.

Zum sicheren Nachweis kleiner Mengen HbF ist die Objektträgermethode sogar der chemischen Nachweismethode überlegen, obwohl dieser sonst zur quantitativen Erfassung der Vorzug zu geben ist.

Die angeführten Befunde und Ergebnisse zeigen, wie vielfältig die Unterschiede sind, je nachdem, mit welchen experimentellen Voraussetzungen und Methoden man Erythrozyten und Hämoglobin von Feten und Erwachsenen analysiert. So liegt die Schwierigkeit auf der Hand, die Objektträgermethode richtig zu beurteilen, solange der Mechanismus ungeklärt ist, vor allem, weil diese Nachweismethode aus mehreren Teilschritten besteht.

Ein wesentlicher Faktor ist dabei wohl die Denaturierung des Hämoglobins durch Lufttrocknung und Alkoholfixation. Erschwerend kommt noch hinzu, daß die Rolle der gleichzeitig denaturierten Membran, die in vivo die selektive Permeabilität und damit ein eigenes Elekrolyt- und Eiweißverteilungsmuster im Erythrozyten gegenüber dem Serum gewährleistet, auf den Austritt des Hämoglobins bei der Elution möglicherweise Einfluß hat. So weisen SZELENY und HOLLAN (49) mit Recht darauf hin, daß die bisher gefundenen funktionellen und strukturellen Unterschiede und die verschiedene chemische Zusammensetzung der Membran fetaler und adulter Erythrozyten die unterschiedliche Elution verursachen könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu klären, welche Bedeutung einerseits der Membran, andererseits dem Zellinhalt für die unterschiedliche Elution von HbF und HbA aus luftgetrokkneten und fixierten Erythrozyten zukommt. Eine Klärung dieser grundsätzlichen Frage könnte Verbesserungsmöglichkeiten der Methode zeigen und würde ihren objektiven Wert weiter verbessern.

Bei den folgenden Untersuchungen wird prinzipiell so vorgegangen, daß nach einer Analyse der einzelnen Teilschritte der Methode die Elution nach Veränderungen an Membran und Zellinhalt ausgeführt wird und schließlich Eigenschaften des Hämoglobins in Modellversuchen besonders untersucht werden.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1 MATERIAL UND METHODEN

2.11 Methodische Grundlagen zur Darstellung von HbF in Erythrozyten fixierter Blutausstriche (Objektträgermethode).
BETKE,K. (2); BETKE,K. und E.KLEIHAUER (3); KLEIHAUER,E. et al. (27) .

Material :

1) Frisches Erwachsenen- und Nabelschnurzitratblut.*
2) Äthylalkohol 80%, der aus 96%-igem vergälltem Äthanol hergestellt werden kann.
3) Zitronensäurephosphatpuffer nach McIlvaine, pH 3,2.
Das pH erhält man durch Mischen der beiden Stammlösungen A und B, die getrennt aufbewahrt werden.
Lösung A : 0,2 M Na_2HPO_4 x 2 H_2O.
Lösung B : 0,1 M Zitronensäure, DAB 6.
Mischungsverhältnis für pH 3,2 : 24,7 ml Lösung A, 75,3 ml Lösung B.
Das Puffergemisch muß vor Verwendung zur Elution durch Erwärmen auf 70 bis 80°C entgast werden, oder 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt werden, da sich sonst Luftblasen auf dem Objektträger absetzen, die die Elution stören.
4) Hämatoxilin sauer nach Ehrlich.
5) 0,1%-ige wässerige Erythrosinlösung.

Methode :

Dünne, etwa 40 Minuten luftgetrocknete Blutausstriche werden 5 Minuten in 80%-igem Äthanol fixiert, anschließend unter fließendem Wasser abgespült und luftgetrocknet. Die Ausstriche werden dann senkrecht in ein Becherglas mit dem Puffer gestellt und 3 bis 5 Minuten darin belassen. Zur Durchmischung des Puffers und des herausgelösten Hämoglobins werden die Ausstriche nach einer und zwei Minuten einmal kurz herausgehoben und wieder zurückgestellt.

---

* Ich danke Herrn Professor Dr. med. Roemer, Direktor der Universitätsfrauenklinik, für die Überlassung der Nabelschnurblutproben.

Nach der Elution werden die Präparate wieder unter fließendem Wasser abgespült, dann 3 Minuten in Hämatoxylin und nach erneuter Wässerung 3 Minuten in Erythrosin gefärbt.

Die Beurteilung und Auszählung der Erythrozyten erfolgt bei 45o-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Zur leichteren Zählung engt man das Gesichtsfeld durch runde oder viereckige ausgestanzte Papierblenden ein und unterteilt es zusätzlich noch, z.B. durch ein Okularnetz.

Entsprechend der stärkeren oder schwächeren Elution werden 3 verschiedene Zelltypen unterschieden :

Voll eluiert: Zellen leer, nicht angefärbt, nur noch die Konturen sichtbar = HbA-Zellen (Erythrozyten mit adultem Hämoglobin).

Teilweise eluiert: Die Zellen erscheinen nach der Färbung rosa bis schwach rot getönt; sogenannte Intermediärzellen. (Erythrozyten, die adultes und fetales Hämoglobin in unterschiedlicher Menge enthalten).

Nicht eluiert: Die Zellen nehmen entsprechend dem hohen Hämoglobingehalt viel Farbstoff auf und färben sich deshalb stark rot an = HbF-Zellen (Erythrozyten mit vorwiegend fetalem Hämoglobin).

Ausgezählt werden jeweils 1000 Zellen bei 2 Ausstrichen gleicher Vorbehandlung.

2.12 Versuche zur Objektträgermethode.

2.121 Variation der Lufttrocknungszeiten (Tab. 1).
Die Zeit der Lufttrocknung der Ausstriche wird auf 5 Minuten, 6o Minuten, 1o Stunden und 24 Stunden unter Konstanterhaltung aller anderen Schritte abgewandelt.

2.122 Variation der Äthylalkoholkonzentration (Tab. 2a und b).
Um den Bereich herauszufinden, innerhalb dem sowohl eine ausreichende Fixation als auch eine gute Elution und Anfärbung erzielt wird, wird erst eine grobe Orientierung durch Konzentrationssteigerungen von jeweils 5% von 6o%-igem Äthylalkohol an aufwärts vorgenommen. Die relativ starke Zunahme der Elution bei hohen Konzentrationen wird im Bereich zwischen 85% und 9o% durch Konzentrationssteigerungen von jeweils 1% gezeigt.
Weiterbehandlung der Ausstriche wie bei (2.11) angegeben.

2.123 Variation der Fixationszeit (Tab.3)

Die luftgetrockneten Ausstriche werden 1, 2, 5 und 1o Minuten in 80%-igem Äthylalkohol fixiert.
Weiterbehandlung der Ausstriche wie bei (2.11) angegeben.

2.124 Variation des pH-Wertes des Puffers (Tab.4)

Es wurden Zitronensäurephosphatpufferlösungen nach McIlvaine mit einem pH-Bereich zwischen 3,2 und 3,6 verwendet. Die quantitative Zusammensetzung aus den Stammlösungen wurde den Geigy-Tabellen entnommen.
Weiterbehandlung der Ausstriche wie bei (2.11) angegeben.

2.125 Variation des pH-Wertes des Puffers mit und ohne Brilliantkresylblauinkubation (Tab.5)

Ein Teil des Blutes wird vor dem Ausstreichen 2o Minuten lang in o,5%-iger Brilliantkresylblaulösung inkubiert, bevor es wie das restliche Zitratblut ausgestrichen wird. Anschließend Elution der Präparate in verschiedenen Pufferlösungen.
Weiterbehandlung der Ausstriche wie bei (2.11) angegeben.

2.126 Variation der Elutionszeiten (Tab.6)

Nach einer Elutionsdauer von 1, 3, 1o, 2o, 3o und 4o Minuten werden die Ausstriche weiterbehandelt wie bei (2.11) angegeben.

2.13 Versuche mit Vitalfarbstoffen

2.131 Versuche mit Brilliantkresylblau an Erythrozyten verschiedenen Alters (Tab.7, Abb. 2 und 3)

Zur Trennung von alten und jungen Erythrozyten wurde die Methode der Schichtungszentrifugation verwendet.
Hierbei handelt es sich im Prinzip um ein Verfahren, das durch hochtouriges Zentrifugieren eine Trennung von Zellen unterschiedlicher Dichte erlaubt. Dabei reichern sich die spezifisch leichteren jungen Zellen - besonders auch die Retikulozyten - in den oberen Schichten an. Eine Anreicherung alter Zellen in den unteren Schichten findet man bei Blut von Neugeborenen und Säuglingen, nicht so deutlich bei Erwachsenenblut (48).

Das Zitratvenenblut wird 10 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert und das überstehende Plasma anschließend abgehoben. Das verbleibende Sediment füllt man in schmale, hohe Zentrifugengläser, damit eine bessere Schichtung eintritt, und zentrifugiert bei 6000 U/min 2o Minuten lang. Aus den oberen, mittleren und unteren Schichten werden jeweils kleine Proben entnommen und wieder zur entsprechenden Menge des vorher abgehobenen Plasmas zugesetzt. Der eine Teil wird so ausgestrichen, der andere Teil nach 20-minütiger Inkubation mit 0,5%-iger Brilliantkresylblaulösung. Neben der Differenzierung der drei Zelltypen werden die Retikulozyten der einzelnen Zellschichten nach der Brilliantkresylblaumethode quantitativ bestimmt. Die Behandlung der inkubierten und der nicht inkubierten Erythrozyten in den Ausstrichen erfolgt im Prinzip wie bei (2.11) angegeben.

2.132 Versuche mit den Vitalfarbstoffen Acridinorange, Nilblausulfat, Brilliantkresylblau und Methylviolett (Tab.8)
Nabelschnurblutproben werden mit gleichen Mengen der oben genannten Vitalfarbstofflösungen (0,5%-ig) in der feuchten Kammer 2o Minuten lang inkubiert und dann ausgestrichen.

Weiterbehandlung der Ausstriche wie bei (2.11) angegeben. Zum Vergleich werden jeweils Normalausstriche angefertigt.

2.133 Retikulozytenzählung in Nabelschnurblutproben nach Inkubation mit Nilblausulfat, Brilliantkresylblau und Acridinorange. (Tab.9)
Die mit den oben genannten Vitalfarbstoffen inkubierten Blutproben werden ausgestrichen und die Zahl der Retikulozyten unter 1000 Erythrozyten ausgezählt. Die Zahlen der Retikulozyten werden untereinander und mit den entsprechenden Elutionsversuchen verglichen.

2.14 Veränderung der Membraneigenschaften.

2.141 Erwärmung des Blutes auf 49°C (Tab.1o)
Nabelschnurblut wird im Reagenzglas in ein Wasserbad von 49°C gestellt und immer wieder leicht umgeschüttelt. Nach 1, 2, 5, 1o und 15 Minuten werden je 0,1 ccm mit

einer Pipette entnommen und gleich ausgestrichen.
Weiterbehandlung der Ausstriche wie bei (2.11) angegeben.

2.142 Erythrozyten aus hyper-, normo-, und hypotonen Kochsalzlösungen (Tab.11)
Nabelschnurblut wird nach Abheben des Serums 3 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Gleiche Mengen des Sediments werden mit o,6-, o,9- und 1,2%-iger Kochsalzlösung versetzt und 20 Minuten lang inkubiert, anschließend ausgestrichen.
Weiterbehandlung der Ausstriche wie bei (2.11) angegeben.

2.143 Behandlung der Erythrozyten mit Papain (Tab.12)
Nabelschnurblut wird zentrifugiert, das überstehende Plasma abgehoben und das verbleibende Sediment 5 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Daraus wird eine 3-5%-ige Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.
Gleiche Teile einer bei 37°C aktivierten Papain "Biotest"-lösung und der Erythrozytenkochsalzsuspension werden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.
Nach 30, 60, 80 und 12o Minuten werden jeweils 0,5 ccm abpipettiert, die Suspensionsflüssigkeit davon abzentrifugiert und das verbleibende Sediment in 0,1 ccm Plasma aufgeschwemmt und ausgestrichen.
Weiterbehandlung der Ausstriche wie bei (2.11) angegeben.

2.15 Veränderung der Zustandsform des intrazellulären Hämoglobins (Tab.13)
Nabelschnurblut wurde zunächst mit 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen und zur Änderung der Zustandsform des Blutfarbstoffes mit verschiedenen Reagenzien versetzt.

a) Zellen mit oxygeniertem Normalhämoglobin (Oxy-Hb).
Dazu wird :
1 ccm Sediment mit 1 ccm o,9%-iger NaCl-Lösung oder mit 1 ccm 1,25%-iger $NaNO_3$-Lösung versetzt (kontrolle zu b)

b) Methämoglobinhaltige Zellen (Met-Hb). Dazu werden 2 ccm Sediment mit 1 ccm 1,25%-iger $NaNO_2$-Lösung versetzt.

Diese 3 Ansätze bleiben 20 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen und werden dann mit physiologischer Kochsalzlösung 5 mal gewaschen. Dann wird die ursprüngliche Plasmamenge wieder zum Sediment zugegeben und daraus Ausstriche hergestellt.

c) Cyanmethämoglobinhaltige Zellen (Hb-III-CN.) Dazu wird 1 ccm der Met-Hb-Probe mit 0,02 ccm 1%-iger KCN-Lösung versetzt.

d) Oxy-Hb-Zellen mit Zusatz von KCN (Oxy-CN-Hb), als Kontrolle zu c). Dazu werden 0,5 ccm der Oxy-Hb-Probe mit $NaNO_3$ mit 0,05 ccm 1%-iger KCN-Lösung versetzt.

e) Kohlenmonoxydhaltige Erythrozyten (CO-Hb). Dazu werden 0,5 ccm der Oxy-Hb-Probe mit NaCl 5 Minuten lang mit Kohlenmonoxyd (Leuchtgas) durchströmt.

f) Erythrozyten mit reduziertem Hämoglobin (Red. Hb). Dazu werden 0,5 ccm der Oxy-Hb-Probe mit NaCl mit einigen Kristallen Natriumdithionit versetzt.

Alle 7 Proben werden wie bei (2.11) ausgestrichen, fixiert und eluiert.

2.16 Modellversuche

2.161 Die Filterpapiermethode

Die in den eigenen Versuchen verwandte Methode differiert in einigen Punkten von dem von BETKE und KLEIHAUER angegebenen Modell (3).

1) Herstellung der Hämolysate aus Erwachsenen- und Nabelschnurblut: Das Plasma wird jeweils abzentrifugiert und das Sediment 5 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. 100 ccm Erythrozytensediment werden mit 50 ccm Aqua dest. hämolysiert und 25 ccm Tetrachlorkohlenstoff zugegeben. Dieses Gemisch wird 3 Minuten lang kräftig geschüttelt, dann in hohe schmale Zentrifugengläschen gefüllt und bei 6000 U/min 2o Minuten lang zentrifugiert. Über den absedimentierten Stromabestandteilen kann das klare Hämolysat abgehoben werden. Die Hämolysate werden auf 1og% Hb eingestellt.

2) Auf gleich große Filterpapierstücke wird jeweils 1 ccm der 1o%-igen Hämolysate beider Blutarten gleichmässig verbreitet und etwa 4o Minuten luftgetrocknet. Die Fixation des eingetrockneten Hämoglobins für die Dauer von 5 Minuten erfolgt mit 8o%-igem Äthanol. Die fixierten trockenen Filterpapierstücke werden in kleine Stückchen zerschnitten und in einen 25o ccm fassenden Meßkolben gebracht. Dann werden 1oo ccm des auf 37°C erwärmten Puffers zugegossen und der Kolben ins Wasserbad gestellt, dessen Temperatur ebenfalls 37°C beträgt.

In Vorversuchen wurden zwei verschiedene Methoden erprobt, um eine möglichst gleichmäßige Elution zu erreichen.

(a) Die Filterpapierstückchen werden durch einen Magnetrührer in dauernder Bewegung gehalten. Diese Methode hat aber den Nachteil, daß nach etwa 15 bis 2o Minuten die Filterpapierstückchen auffasern, wobei sich die Oberfläche in nicht vorhersehbarer Weise vergrößert.

(b) Das Filterpapier-Puffergemisch wird etwa alle 5 Minuten umgeschüttelt, um auftretende Konzentrationsunterschiede auszugleichen. Die Oberfläche bleibt hier unverändert, woraus sich eine gleichmäßigere Elution ergibt.

Für die Hauptversuche wird die Methode der Versuchsanordnung (b) verwandt. Aus der Elutionslösung werden zur Konzentrationsbestimmung nach 1, 2, 3, 5, 1o, 2o, 4o und 6o Minuten mit einer Pipette jeweils 0,2 ccm entnommen.

Dieses Modell wird ähnlich wie bei den Versuchen mit Objektträgern in folgender Weise variiert:

2.1611 Verlängerung der Lufttrocknungszeit (Abb.4)
Mit Hämolysaten aus Nabelschnur- und Erwachsenenblut getränkte Filterpapierstücke werden 4o Minuten bzw. 3o Stunden luftgetrocknet, in 8o%-igem Alkohol fixiert und dann im Zitronensäurephosphatpuffer nach McIlvaine bei pH 3,2 eluiert.

2.1612 Erhöhung der Konzentration des Fixationsmittels (Abb.5)
Mit Hämolysaten aus Erwachsenenblut getränkte Filterpapierstücke werden luftgetrocknet, in 96%-igem Äthylalkohol fixiert und dann bei pH 2,8, 3,2 und 3,5 eluiert.

2.1613 Variation des pH-Wertes des Puffers (Abb. 6 und 7)
Mit Hämolysaten aus Nabelschnur- und Erwachsenenblut getränkte Filterpapierstücke werden nach Lufttrocknung und Fixation mit 80%-igem Alkohol bei Puffer-pH-Werten von 2,8, 3,2 und 3,5 eluiert.

2.1614 Variation der Temperatur des Elutionspuffers (Tab.14)
Mit Hämolysaten aus Nabelschnurblut getränkte Filterpapierstücke werden nach Lufttrocknung und Fixation in 80%-igem Alkohol bei pH 3,2 und einer Puffertemperatur von 18°C und 5o°C eluiert.

3) Konzentrationsbestimmung. Zur quantitativen Erfassung der bei diesen Modellversuchen aus dem Filterpapier eluierten Menge von Hämoglobin fand die Methode der Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (31) in der Modifikation nach PROBST (35) Verwendung. Bei großer Empfindlichkeit hat die Methode den Nachteil, daß sie bei verschiedenen Proteinen ganz unterschiedliche Extinktionen liefert, weil das Reagenz von Folin und Ciocalteu spezifisch mit den Tyrosinmolekülen reagiert. Da HbA 10 Tyrosinmoleküle/Mol Hb, HbF aber nur 8/Mol enthält, wurden für beide Blutarten eigene Eichkurven aufgestellt.

Reagenzien zur Proteinbestimmung nach LOWRY et al., modifiziert nach PROBST:

a) 2%-ige Na_2CO_3 in 0,9 n NaOH (Reagenz A).
b) 0,5%-$CuSO_4.5\ H_2O$ in 1%-iger Natriumtartratlösung (Reagenz B).
c) 5o ccm Reagenz A + 1 ccm Reagenz B. Dieses Reagenz sollte nicht länger als 5 bis 6 Stunden aufbewahrt werden (Reagenz C).
d) Phenolreagenz nach Folin und Ciocateu (Merck) wird mit NaOH gegen Phenolphtalein als Indikator titriert und entsprechend dem festgestellten Ergebnis auf 1 n NaOH Äquivalenz verdünnt (Reagenz E).

Durchführung: Zu 1 ccm Reagenzlösung C werden 0,1 ccm der aus dem Kolben entnommenen Proben pipettiert. Nach 10 Minuten gibt man 0,1 ccm Reagenz E dazu, das in 1 bis 2 Sekunden mit der übrigen Lösung vollständig vermischt werden muß. Dieser Ansatz bleibt mindestens 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen und wird dann bei 700 nm in 1 cm Mikroküvetten gegen einen Reagenzienleerwert photometriert.
Die beschriebene Methode erfasst 5 bis 80 µg Protein.

4) Aufstellung der Eichkurven: Hämolysate von Nabelschnur- und Erwachsenenerythrozyten werden auf eine Konzentration von 0,1g% eingestellt und als Stammlösungen für Verdünnungsreihen bei der Ermittlung der Eichkurve benutzt. Die Ergebnisse sind in Abb.1 dargestellt.

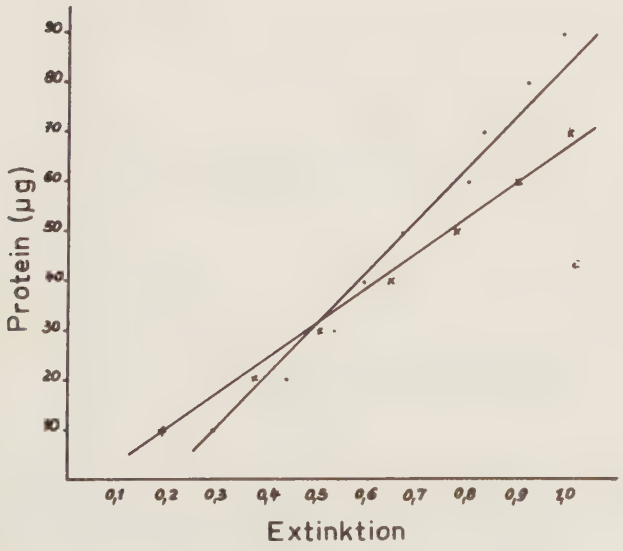

Abb.1 Eichkurven zur photometrischen Proteinbestimmung in Hämolysaten von Erwachsenen- (:--.) und Nabelschnurblut (x--x).

3.162 Untersuchungen über die Löslichkeit von getrocknetem und pulverisiertem Erwachsenen- und Nabelschnurblut (Abb.8)
Nicht gewaschenes Erwachsenen- und Nabelschnurblut wird auf Glasplatten ausgestrichen, luftgetrocknet und fixiert. Die Nabelschnurblutausstriche werden zusätzlich im Zitronensäurephosphatpuffer nach McIlvaine bei pH 3,2 eluiert, um das HbA herauszulösen. Dann werden die trockenen Blutfilme abgekratzt und pulverisiert.

Die pulverisierten Blutfilme (Hämoglobin und Zellbestandteile) werden in steigenden Mengen von 0,02 g bis 0,22 g zu 1 ccm Zitronensäurephosphatpuffer vom pH 3,2 gegeben und für 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C stehen gelassen. Dann wird die Konzentration des jeweils in Lösung gegangenen Hämoglobins im abzentrifugierten Überstand mittels der Cyan-Methämoglobinmethode nach BETKE und SAVELSBERG (7) bestimmt.

2.2 ERGEBNISSE

Erklärung von Abkürzungen: NS-Blut = Nabelschnurblut
A-Blut = Erwachsenenblut
R = Retikulozyten

Bei den Versuchen 2.22 bis 2.25 handelt es sich jeweils um Mittelwerte aus zwei Messungen. Die Ergebnisse der Auszählungen von voll-, teil- oder nicht eluierten Zellen sind in allen Tabellen in Promille-Werten angegeben.

2.22 Versuche zur Objektträgermethode

2.221 Variation der Lufttrocknungszeiten. (Tab. 1).
Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, nimmt mit zunehmender Lufttrocknungszeit der Nabelschnurblutausstriche die Zahl der voll eluierten (HbA-Zellen) und der teilweise eluierten Zellen (Intermediärzellen) ab.

Trocken-zeit	Voll eluiert	Teilw. eluiert	Nicht eluiert
5'	22	16	962
60'	22	17	961
10 Std.	8	15	977
24 Std.	0	0	1000

Tabelle 1 Elutionsergebnisse nach verschiedenen Lufttrocknungszeiten von Nabelschnurblutausstrichen.

So findet sich zwischen 5 und 60 Minuten Lufttrocknungszeit ein nahezu konstantes Elutionsausmaß, während nach 24 Stunden kein Hämoglobin mehr eluiert wird.

2.222 Variation der Äthylalkoholkonzentrationen

a) Beurteilung des Ausstriches nach Morphologie und Anfärbbarkeit der Zellen nach Fixation mit verschiedenen Alkoholkonzentrationen. NS-Blut, pH 3,2 (Tab.2a)

Lufttrocknung und Alkoholfixation geben als Denaturierungsvorgänge den ausgestrichenen Erythrozyten das morphologische Gepräge und sind für eventuelle Veränderungen an den Zellen und das Elutionsausmaß von ausschlaggebender Bedeutung. Deshalb ist es naheliegend, zunächst einmal die Erythrozyten nach Fixation und ohne vorherige Elution morphologisch zu beurteilen. Die Ergebnisse, wie sie an Ausstrichen von Nabelschnurblutproben vor und nach Elution erhoben wurden, sind in Tabelle 2a zusammengestellt.

Äthanol-konzentration	Zellmorphologie und Anfärbbarkeit vor Elution	nach Elution
60-65%	Zellmembran deformiert, Zellinneres vakuolig verändert.	Zellen nur schwach angefärbt, deshalb Elution schwierig zu beurteilen.
70%	Zellinneres zum großen Teil noch vakuolig verändert und Zellgrenzen unscharf.	Zellen gut angefärbt und nach Elution unterschiedgefüllt.
75%	Nur noch vereinzelte veränderte Zellformen und Zellinhalte.	Zellen gut angefärbt und eluiert.
80%	In Form und Zellinhalt unauffällig.	Zellen gut angefärbt und eluiert.
85%	Zellen erscheinen im Ganzen etwas kleiner. Morphologisch unauffällig.	Farbe der nicht eluierten Zellen blasser.
90%	Zellen erscheinen kleiner. Morphologisch unauffällig.	Zellen vollständig eluiert Einzelne Retikulozyten mit blaßrosa Schimmer.
95%	Zellen erscheinen kleiner. Morphologisch unauffällig.	Nur noch vollständig eluierte Zellen.

Tabelle 2a Morphologische Beurteilung der Zellen nach Alkoholfixation und Elution.

Es ergibt sich mit steigender Äthylalkoholkonzentration zur Fixation der Erythrozyten eine zunehmende Besserung der Erythrozytenmorphologie, die ab etwa 80% völlig unauffällig ist und eine exakte Beurteilung der Ausstriche erlaubt. Bei höheren Konzentrationen etwa ab 85% Äthanol tritt eine Verkleinerung der Zellen, allerdings ohne wesentliche Alteration von Form und Inhalt auf. Die quantitativen Verhältnisse nach der Elution finden sich in Tabelle 2b.

b) Variation der Äthylalkoholkonzentration zwischen 80 und 88%. NS'Blut, pH 3,2 (Tab. 2b)

Bei quantitativer Auswertung in diesem Konzentrationsbereich zeigt sich eine sprunghafte Zunahme voll eluierter Zellen zwischen 85 und 86% auf nahezu den 3-fachen Wert.

Äthanol-konz.	Voll eluiert	Teilw. eluiert	Nicht eluiert
80%	100	52	348
83%	250	250	500
86%	964	36	0
87%	988	12	0
88%	1000	0	0

Tabelle 2b Abhängigkeit der Elution von der zur Fixation verwendeten Äthanolkonzentration.

Die teileluierten Zellen nehmen von einem Maximum bei 83% bis 88% Äthanol ständig ab.

2.223 Variation der Fixationszeit. NS-Blut, pH 3,2 (Tab. 3). Zur ausreichenden Fixation der Blutausstriche ist eine Zeit von etwa 5 Minuten nötig.

Fixations-zeit	Voll eluiert	Teilw. eluiert	Nicht eluiert
1'	157	32	811
5'	121	45	834
10'	108	48	844
20'	131	41	828

Tabelle 3 Beziehungen zwischen Elution und Fixationszeit.

Zu kurze Einwirkungszeit des Fixationsmittels wie z.B. nur 1 Minute führt zu einer vermehrten Zahl von eluierten Zellen, während längere Fixationsdauer das Ergebnis kaum mehr ändert.

2.224 Variation des pH-Wertes des Puffers. A-Blut (Tab. 4). Tabelle 4 zeigt die Abhängigkeit der Elution adulten Hämoglobins aus Erwachsenenerythrozyten von der Wasserstoffionenkonzentration des Puffers.

pH	Voll eluiert	Teilw. eluiert	Nicht eluiert
3,2	1000	0	0
3,25	998	1	1
3,3	997	3	0
3,35	987	10	3
3,4	968	26	6
3,45	6	24	970
3,5	0	21	979
3,55	0	0	1000
3,6	0	0	1000

Tabelle 4. Erklärung siehe Text.

Im Bereich unter pH 3,2 wird der gesamte Blutfarbstoff aus den Zellen herausgelöst. Oberhalb von pH 3,5 findet keine Elution von adultem Blutfarbstoff mehr statt.

2.225 Variation des pH-Wertes des Puffers mit und ohne Brilliantkresylblauinkubation. NS-Blut (Tab. 5). Wie im vorhergehenden Versuch nimmt auch in Nabelschnurblutausstrichen mit sinkendem pH-Wert die Zahl voll eluierter Zellen zu.

pH	①	②	①	②
3,2	42	208	95	59
3,3	35	85	77	87
3,4	21	37	77	30
3,45	0	14	31	28
3,5	0	14	24	28

	①.	②.
Voll eluiert	①	②
Teilw. eluiert	①	②
Nicht eluiert	①	②

1 = Normalausstrich
2 = Nach Inkubation mit Brilliantkresylblau

Tabelle 5 Elutionsergebnisse mit und ohne Brilliantkresylblau in Abhängigkeit vom pH-Wert. Es sind nur die Daten über teil- und voll-eluierte Zellen angegeben.

Werden die Erythrozyten vor dem Ausstreichen mit Brilliantkresylblau inkubiert, so nimmt die Zahl der voll eluierten Zellen weiter zu, am stärksten bei pH-Werten um 3,2. Die Zahl der intermediären Zellen verändert sich in uncharakteristischer Weise.

2.226 Variation der Elutionszeiten. NS-Blut, pH 3,2 (Tab. 6). 2 Versuchsreihen.
Verlängerung der Elutionszeit führt bei einem konstanten Puffer-PH-Wert von 3,2 fortschreitend auch zu einer Herauslösung von fetalem Hämoglobin.

Elutions-dauer	Voll eluiert	Teilw. eluiert	Nicht eluiert
1'	9 8	14 40	977 952
3'	17 22	10 38	973 940
10'	21 31	33 36	946 933
20'	27 44	10 33	963 923
30'	34 53	29 40	937 907
40'	53	68	879

Tabelle 6 Beziehungen zwischen Elutionsdauer und Zahl eluierter Zellen bei konstantem pH-Wert.

Im Gegensatz zur Elution von adultem Hämoglobin - die nach etwa 2 Minuten abgeschlossen ist - ist die Elution von fetalem Hämoglobin aber stark verzögert, wie aus der langsamen Zunahme voll- und teilweise eluierter Zellen bei Elutionszeiten bis zu 40 Minuten hervorgeht.

2.23 Versuche mit Vitalfarbstoffen.

2.231 Versuche mit Brilliantkresylblau an Erythrozyten verschiedenen Alters. NS- und A-Blut (Tab. 7, Abb. 2 und 3).
Bei Differentialzentrifugation von Erythrozytensediment zeigen Ausstriche aus den oberen retikulozytenreicheren Schichten nach Brilliantkresylblauinkubation eine verhältnismäßig stärkere Zunahme voll eluierter Zellen als solche aus mittleren und unteren Schichten.

Sie liegt jedoch niedriger als die Zahl der Retikulozyten in dieser Schicht.

		A-Blut				R	NS-Blut				R
Schicht-höhe	pH	①	②	①	②		①	②	①	②	
	3,2	0	0	0	0	14	28	46	32	30	80
	3,3	0	0	1	0		20	21	20	27	
Oben	3,4	1	0	36	0		6	18	16	23	
	3,45	14	0	80	3		4	8	18	26	
	3,5						2	3	7	20	
	3,2	0	0	0	0	5	13	14	22	11	13
	3,3	0	0	1	0		6	8	6	17	
Mitte	3,4	0	0	7	0		0	6	6	12	
	3,45	1	0	38	4		0	4	7	3	
	3,5						0	3	3	8	
	3,2	0	0	0	0	3	6	5	10	16	3
	3,3	0	0	0	0		4	5	9	9	
Unten	3,4	0	0	2	0		1	2	3	5	
	3,45	3	0	21	1		0	3	5	5	
	3,5						0	3	2	4	
	3,2	0	0	0	0	6	22	18	25	10	35
	3,3	0	0	0	0		9	17	17	11	
Normal	3,4	0	0	5	0		6	9	12	12	
	3,45	4	0	16	0		3	6	11	13	
	3,5						1	5	5	12	

Tabelle 7 Vergleich der Elutionsergebnisse in alten und jungen Erythrozyten unter verschiedenen Bedingungen. Zeichensymbole vgl. Tabelle 5. R = Zahl der Retikulozyten in ‰

Für Nabelschnurblut ist dies schon sehr deutlich bei pH 3,2, dem pH-Wert des Puffers bei der Elutionsmethode, während die Unterschiede bei A-Blut erst bei höheren pH-Werten deutlich werden.

Die nach der Inkubation mit Brilliantkresylblau hinzugekommenen voll eluierten Zellen sind dadurch gekennzeichnet, daß in ihrem Zelleib feingranuläre Strukturen ausgefallen sind. Es handelt

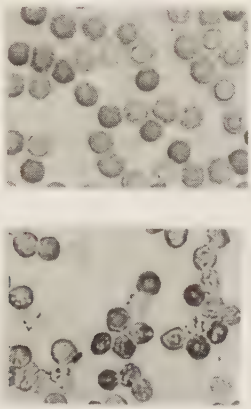

Abb. 2 Vergleich von Nabelschnurblutausstrichen vor und nach Inkubation mit Brilliantkresylblau aus der oberen Schicht einer Blutsäule nach Differentialzentrifugation. Oben vor, unten nach der Inkubation.

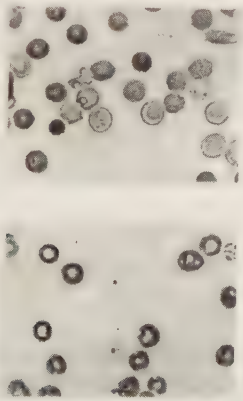

Abb. 3 Vergleich von Nabelschnurblutausstrichen vor und nach Inkubation mit Brilliantkresylblau aus der unteren Schicht einer Blutsäule nach Differentialzentrifugation. Oben vor, unten nach der Inkubation.

sich dabei um die sogenannte Substantia granulofilamentosa der Retikulozyten.

2.232 Versuche mit den Vitalfarbstoffen Acridinorange, Nilblausulfat, Brilliantkresylblau und Methylviolett. NS-Blut, pH 3,2, (Tab. 8).
Die Zahl voll eluierter Zellen ist abhängig von der Art des Vitalfarbstoffes und zeigt eine Abnahme in folgender Reihenfolge: Nilblausulfat, Acridinorange, Brilliantkresylblau, Methylviolett, Normalausstriche.

	Normalausstriche	Acridinorange	Nilblausulfat	Brilliantkresylblau	Methylviolett		Normalausstriche	Acridinorange	Nilblausulfat	Brilliantkresylblau	Methylviolett		Retikulozyten (%)
Voll eluiert	74		137	94	81	Teilw. eluiert	28		37	32	42		5
	68	89	107	81	75		45	64	48	50	47		38
	23	33	47	27	23		33	42	57	37	48		39
	23	65	47	26	33		36	45	42	36	35		42
	61	77	87	76	57		37	52	44	44	38		18

Tabelle 8 Vergleich der Elutionsergebnisse von Nabelschnurblut, das vor dem Ausstreichen mit verschiedenen Vitalfarbstoffen inkubiert wurde.

Zwischen der Zahl voll eluierter Zellen und den mit der Brilliantkresylblaumethode ausgezählten Retikulozyten besteht hier keine Korrelation.

2.233 Retikulozytenzählung in Nabelschnurblutproben nach Inkubation mit Nilblausulfat, Brilliantkresylblau und Acridinorange. Ergebnisse aus 5 Versuchen (Tab. 9).
Brilliantkresylblau erzeugt nahezu die doppelte Menge an Retikulozyten wie Acridinorange und Nilblausulfat.

Nilblausulfat	Brilliantkresylblau	Acridinorange
	Retikulozytenzahl (‰)	
14	23	11
13	27	13
15	27	14
12	24	9
23	30	23

Tabelle 9 Vergleich der Retikulozytenzahlen in gleichen Blutproben nach Inkubation mit verschiedenen Vitalfarbstoffen.

Bei Inkubation vor dem Ausstreichen resultiert jedoch bei diesen Farbstoffen eine höhere Zahl voll eluierter Zellen (Vgl. Tab. 8).

2.24 Veränderungen der Membraneigenschaften.

2.241 Erwärmung des Blutes auf 49°C. NS-Blut, pH 3,2 (Tab. 1o). Auch längere Erwärmung des Blutes bis zu 15 Minuten führt zu keiner eindeutigen Änderung des Elutionsausmaßes gegenüber Normalausstrichen.

Inkubations-dauer	Voll eluiert	Teilw. eluiert	Nicht eluiert
1'	39	46	915
3'	54	37	909
5'	80	36	884
10'	49	33	918
15'	64	34	902
Normal	45	48	907

Tabelle 1o Elutionsergebnisse nach verschieden langer Erwärmung des Blutes.

Die Erythrozyten waren in Form und Größe nicht verändert. Hämolyse wurde nicht beobachtet.

2.242 Erythrozyten aus hyper-, normo- und hypotonen Kochsalzlösungen. NS-Blut, 2 Versuchsreihen (Tab. 11).
Erhöhte und erniedrigte Konzentrationen der Erythrozytensuspensionslösungen führen gleicherweise zu einer Erhöhung voll- und teileluierter Zellen.

NaCl-Konz.	Voll eluiert		Teilw. eluiert		Nicht eluiert	
0,6%	324	205	189	145	487	650
0,9%	397	144	146	98	547	758
1,2%	381	156	174	116	445	728

Tabelle 11 Vergleich der Elutionsergebnisse nach Vorinkubation der Erythrozyten in Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration.

Während die Zellen aus den normo- und hypotonen Lösungen morphologisch unauffällig blieben, waren jene aus den hypertonischen Lösungen insgesamt kleiner und vielfach deformiert.

2.243 Behandlung der Erythrozyten mit Papain. NS-Blut (Tab. 12).
Nach Andauung der Membran mit dem proteolytischen Ferment fand sich nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten makroskopisch Hämolyse.

Inkubationsdauer	Voll eluiert	Teilw. eluiert	Nicht eluiert
30'	20	25	955
60'	26	22	952
80'	20	24	956
120'	13	25	962
Normal	23	11	966

Tabelle 12 Elutionsergebnisse nach Vorinkubation der Erythrozyten mit Papain.

Die Zahl voll- und teileluierter Zellen variiert aber kaum nach verschieden langen Einwirkungszeiten. Morphologisch waren die Zellen unauffällig.

2.25 Veränderung der Zustandsform des intrazellulären Hämoglobins. NS-Blut, 2 Versuchsreihen (Tab. 13),

Zustandsform	Voll eluiert		Teilw. eluiert		Nicht eluiert	
Oxy-Hb (NaCl)	16	9	29	13	955	978
Oxy-Hb ($NaNo_3$)	4	2	10	7	986	991
Met-Hb	13	14	8	15	979	971
Hb-III-CN	14	4	13	11	973	985
Oxy-CN-Hb	13	2	15	5	972	993
CO-Hb	7	3	27	10	966	987
Red.Hb	14	0	14	5	972	995

Tabelle 13 Elutionsergebnisse bei verschiedenen Zustandsformen des Blutfarbstoffs.

Oxydation oder Austausch der Bindungspartner des Eisens im Hämmolekül haben keinen klaren Einfluß auf die Anzahl voll- und teileluierter Zellen.

2.26 Modellversuche.

2.261 Die Filterpapiermethode.

2.2611 Verlängerung der Lufttrocknungszeit. NS- und A-Blut (Abb.4).

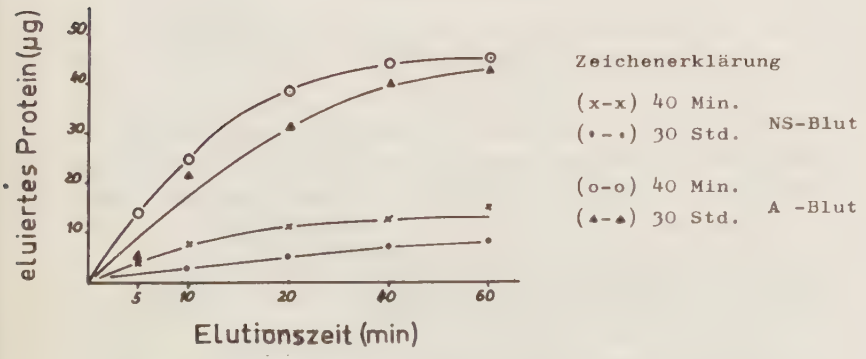

Abb. 4 Ausmaß der Elution bei pH 3,2 in Abhängigkeit von der Lufttrocknungszeit.

Verlängerte Lufttrocknungszeit führt bei HbF und HbA zu einer etwa gleich starken Herabsetzung der eluierten Hämoglobinmenge.

2.2612 Erhöhung der Konzentration des Fixationsmittels. A-Blut, Äthanol 96% (Abb. 5).
Verwendung von höher konzentriertem Alkohol für die Fixation der Hämoglobine auf Filterpapier erhöht sowohl die Geschwindigkeit des Elutionsvorganges als auch das

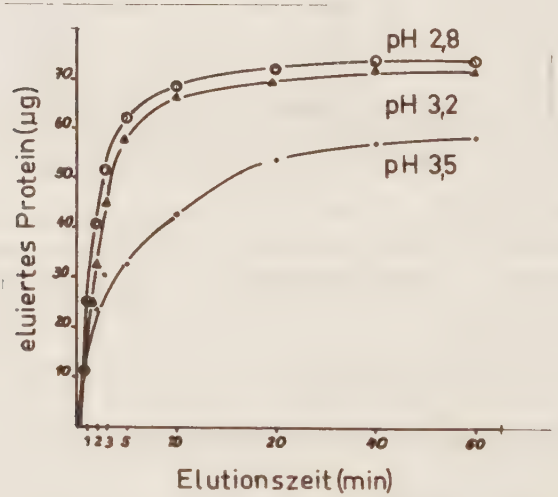

Abb. 5 Elution von adultem Hämoglobin nach Fixation in 96%-igem Äthanol und Elution bei verschiedenen pH-Werten (Vgl. Abb. 6).

Elutionsausmaß. Verglichen mit dem Elutionsausmaß nach Fixation mit 80%-igem Alkohol gleichen sich die eluierten Hämoglobinmengen hier bei allen 3 Puffer-pH-Werten stark an. (Vgl. Abb. 6).

2.2613 Variation des pH-Wertes des Puffers. NS- und A-Blut (Abb. 6 und 7).
Die pH-Abhängigkeit der Elution beider Hämoglobine zeigt sich darin, daß bei steigendem pH-Wert das Elutionsausmaß kleiner, bei sinkendem pH-Wert größer wird. Dabei wird insgesamt mehr HbA als HbF herausgelöst.

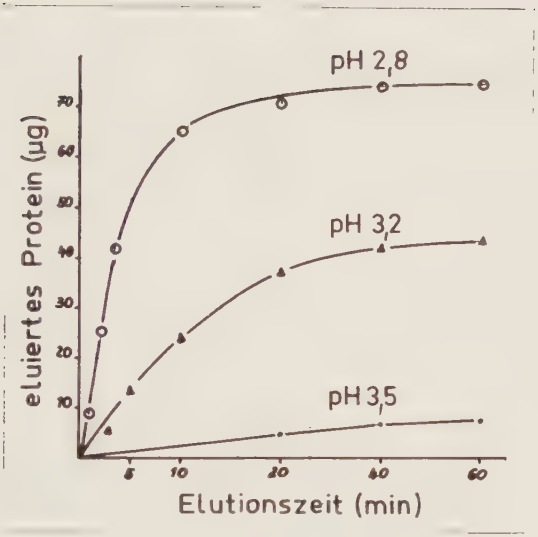

Abb. 6 Elution von adultem Hämoglobin nach Fixation in 80%-igem Äthanol und Elution bei verschiedenen Puffer-pH-Werten.

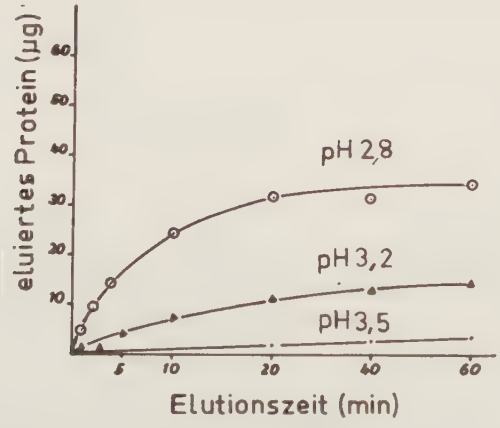

Abb. 7 Elution von fetalem Hämoglobin nach Fixation in 80%-igem Äthanol unter gleichen pH-Bedingungen wie in Abb. 6

2.2614 Variation der Temperatur des Elutionspuffers. NS- und A-Blut (Tab. 14).

Elutions-dauer	Proteingehalt (µg)					
	NS (18°C)	A	NS (37°C)	A	NS (50°C)	A
1'	-	-	1,5	-	3,0	5,9
2'	-	-	1,0	-	3,2	16,3
3'	-	-	1,5	5,5	3,5	19,8
5'	-	-	3,5	14,5	6,0	30,8
10'	1,0	2,5	7,5	24,5	9,0	39,1
20'	3,0	18,5	10,5	38,5	11,5	47,8
40'	5,0	33,0	12,5	43,4	14,5	49,9
60'	7,5	40,0	15,0	43,8	18,0	53,2

Tabelle 14 Bei steigender Temperatur des Elutionspuffers nimmt die eluierte Hämoglobinmenge in geringem Maße zu, und zwar für HbF und HbA in etwa gleichem Ausmaß.

2.262 Untersuchungen über die Löslichkeit von getrocknetem und pulverisiertem Erwachsenen- und Nabelschnurblut (Abb. 8).

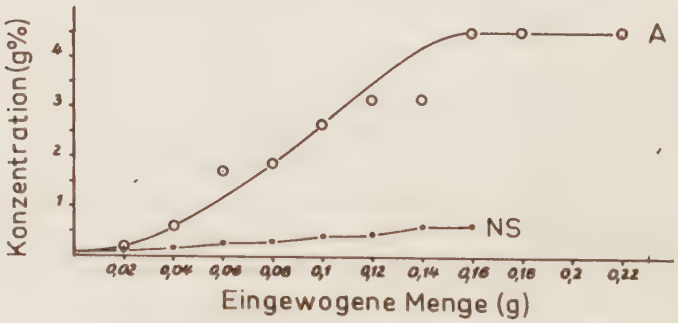

Abb. 8 Im Zitronensäurephosphatpuffer, pH 3,2 nach Mc Ilvaine geht bei einer Temperatur von 37°C innerhalb von 2 Stunden nahezu 7 mal mehr HbA in Lösung als HbF.

3. DISKUSSION

Es muß am Anfang aller Überlegungen zum Mechanismus der Elutionsmethode stehen, daß es sich bei den Erythrozyten der fixierten Blutausstriche um denaturierte Zellen handelt, die nicht mehr mit lebenden Zellen und deren besonderen Eigenschaften verglichen werden können. Um dies zu zeigen, sei das Prinzip der Elutionsmethode noch einmal kurz zusammengefasst:

Nach Lufttrocknung und Alkoholfixation wird fetales Hämoglobin durch saure Pufferlösungen um pH 3,2 langsamer aus Erythrozyten herausgelöst als adultes Hämoglobin. Deshalb findet sich nach einer bestimmten Elutionszeit nur noch HbF in den Zellen, das sich färberisch nachweisen lässt.

Als Ursache der verschiedenen Eluierbarkeit von HbF und HbA kommen grundsätzlich zwei Faktoren in Betracht: Die Membran und der Zellinhalt, die beide in Erwachsenen- und Nabelschnurerythrozyten unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. [Übersicht bei KLEIHAUER (25)]. Weiterhin muß erörtert werden, ob sich nicht die bei der Objektträgermethode notwendige Lufttrocknung und Alkoholfixation auf beide Zellarten, fetale und adulte Erythrozyten, unterschiedlich auswirken, worauf SZELENY und HOLLAN (49) hingewiesen haben.

1) Die Membran

Die Frage, ob die rote Blutzelle von einer definierten Membran umgeben ist, wurde lange Zeit vorbehaltlos bejaht, weil sich die Zelle in mancher Hinsicht wie ein Osmometer verhält. In jüngster Zeit mehren sich jedoch die Untersucher, die daran zweifeln, daß zur Aufrechterhaltung der Homöostase wirklich eine Membran notwendig ist (34, 51).

Exakte elektronenoptische Untersuchungen wurden bisher nur an Erythrozyten angestellt, die nach schonender osmotischer Hämolyse als sogenannte Schatten vorlagen. Diese leeren Schatten bestehen aus einer Membran im Sinne einer streng zytologischen Definition, d.h., einer scharfen zweiseitigen Begrenzung (30). Die Dicke dieser Membran schwankt zwischen 50 und

500 Å, je nach der Präparationsmethode.

Die Analyse ergibt, daß die Membran fast ausschließlich aus Lipoproteiden oder Lipoproteinkomplexen besteht. Bei den Proteinen handelt es sich hauptsächlich um schwerlösliche Struktureiweiße, daneben auch um Proteine und Proteide mit enzymatischer Wirksamkeit (30, 33, 34).

Die Zusammensetzung aus diesen Grundbausteinen ist aber bei Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten verschieden. CROWLEY, WAYS und JONES (12) fanden in Nabelschnurerythrozyten im Mittel höhere Werte für Gesamtlipide, Cholesterin und Phospholipide. Ebenso ist ein höherer Sphingomyelingehalt und ein extrem niedriger Anteil der Linolensäure in Membranen fetaler Erythrozyten charakteristisch.

Auf Grund weiterer funktioneller und ultrastruktureller Verschiedenheiten zwischen Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten sowie durch Untersuchungen an pathologisch veränderten roten Blutzellen vermuten SZELENY und HOLLAN (49), daß unterschiedliche Membranzusammensetzung Ursache der unterschiedlichen Elution von HbF und HbA sei.

Damit stellt sich zunächst die Frage, ob Einwirkung von Luft und Alkohol Membranstrukturen so verändern kann, daß der Austritt von Hämoglobin aus der Zelle beeinflusst wird.

Darüber sollen die Variation der methodischen Faktoren, wie Änderung der Lufttrocknungszeit, der Fixationszeit und der Konzentration des Fixationsmittels Auskunft geben.

a) Die Lufttrocknungszeit.

Es genügt schon kurzfristige Lufttrocknung eines Blutausstriches, um die normalen Ionenregulationsmechanismen der Zelle zu zerstören. Bringt man nämlich einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf die nur luftgetrockneten Erythrozyten, so tritt sofort Hämolyse ein (3). Dieser erste Denaturierungsschritt, die Lufttrocknung, führt also dazu, daß Ionen ungehindert ein- und Hämoglobinmoleküle austreten können.

Die schwierigere Elution luftgetrockneter älterer Ausstriche kann theoretisch genausogut auf der fortschreitenden Dena-

turierung der Membran wie auch des Hämoglobins beruhen (Tab.1). Bei isolierter Betrachtung des Hämoglobins nach längeren Trocknungszeiten zeigt dieses aber gerade die Eigenschaft abnehmender Eluierbarkeit (Abb.4), sodaß diese Eigenschaft durchaus dem Hämoglobin zugeschrieben werden könnte.

b) Fixationszeit.

Der zweite, stärkere Denaturierungsschritt ist die Alkoholfixation. Alkohol wirkt fällend auf Eiweiße und löst Phospholipoide und Lipoproteide. Die Membran müsste also dünner und durchlässiger werden.

Länger als 2 Minuten fixierte Ausstriche geben jedoch in physiologischer Kochsalzlösung und in Wasser kein Hämoglobin mehr ab, wie dies bei nur luftgetrockneten Präparaten der Fall ist. Das könnte mit einer stärkeren Vernetzung der Membran durch die Alkoholdenaturierung zu erklären sein. Wenig einleuchtend ist dann allerdings, daß Hämoglobin im sauren Milieu die Membran passieren kann. Es muß also auch zu einer Fixation des Hämoglobins kommen, das nur im sauren Milieu diffusibel wird. Auf die Fähigkeit des Hämoglobins zur Dissoziation wird noch näher eingegangen.

Längere Fixationsdauer als 2-5 Minuten ändert das Elutionsergebnis kaum mehr. Die Denaturierung des Hämoglobins und der Membran ist also ein Vorgang, der in wenigen Minuten abläuft, nach einer Minute allerdings noch unvollständig ist, was sich in einer stärkeren Elution äußert (Tab.3).

c) Konzentration des Fixationsmittels.

Erhöhung der Konzentration des Äthylalkohols über 80% führt nicht nur auf Objektträgern zu vollständiger Elution auch des HbF aus Erythrozyten (Tab.2b), sondern auch im Modellversuch der Filterpapiermethode zu einer deutlich vermehrten Elution (Abb.5). Auch dies spricht gegen den Einfluß der Membran zugunsten einer besseren Eluierbarkeit des Hämoglobins durch die Fixation.

Bei sinkender Konzentration des Äthylalkohols zeigen die Zellen auf dem Objektträger Unschärfe und Deformierung der

Zellkonturen, vakuolige Veränderung des Zellinnern und nur schwache Anfärbung. Hämolyse durch ungenügende Fixation, die hier sicher zu der geringeren Anfärbung führt, zeigt die Bedeutung einer ausreichenden Fixierung als Voraussetzung zur eindeutigen Beurteilung der Ausstriche (Tab.2a).

Wie schon erwähnt, besteht die denaturierte Membran hauptsächlich aus Eiweiß und Lipiden. Auf diesem Befund beruhen weitere Versuche, die sich speziell mit der Rolle der Membran beschäftigen.

Bei der Einwirkung von Wärme auf Erythrozyten treten ausgesprochene Strukturveränderungen auf, und zwar zerfallen die Blutkörperchen nach kurzer Zeit bei Temperaturen über 47,5°C inkleine und kleinste Kügelchen. Der Schmelzpunkt, die Art des Ausfließens, das lichtoptische und schließlich das elektronenoptische Bild machen es wahrscheinlich, daß es sich um ausfließende Lipoide der Erythrozytenmembran handelt (21). Dabei tritt keine Hämolyse auf. Als Zeichen starker Strukturveränderungen gehen die Erythrozytenfragmente, wenn sie wieder in den Kreislauf verbracht werden, in kurzer Zeit zugrunde (46).

Bei den eigenen Versuchen ergab sich, obwohl das Blut bis zu 15 Minuten im Wasserbad bei 49°C erwärmt wurde, keine deutlichen Veränderungen der Elutionsergebnisse (Tab.1o).
Wenn eine derartige Umstrukturierung keinen Einfluß auf das Elutionsergebnis nimmt, spricht dies gegen eine wesentliche Änderung des fixen Passagehindernisses, wie es von der Membran gegeben sein könnte.

Die andere Hauptkomponente der Membran bilden die Proteine. Wirken proteolytische Enzyme auf die Oberfläche menschlicher Erythrozyten ein, so lässt sich feststellen, daß sie neuraminsäurehaltige Mukopeptide abspalten. Daneben werden eine Reihe von Antigenen und Rezeptoren inaktiviert und abgebaut, deren Struktur an die von den verschiedenen Proteasen angegriffenen Proteine und Glykoproteide gebunden war (52, 53).

Aufgrund dieser Angaben wurde Blut mit Papain, einem pflanzlichen proteolytischen Enzym, das von GOLDSMITH (16) in die Serologie eingeführt wurde, bis zu 120 Minuten inkubiert (Tab.12). Neben einer ganz geringen Hämolyse bei langer Inkubationszeit ergaben sich keine Unterschiede der Elutionsergebnisse,

verglichen mit normalen Blutausstrichen.

Eine gewisse Dehnung der Außenstrukturen tritt ein, wenn Erythrozyten in hypotone Lösungen gebracht werden und das kritische Volumen von 160% erreichen. Dabei kommt es auch zunehmend zu einer Hämolyse, die neben einer gewissen Porendehnung durch ein Austreten von Hämoglobin bei sinkender Salzkonzentration bedingt ist (29).

Bei den eigenen Versuchen ergaben Ausstriche von Erythrozyten aus hyper- und hypotonen Kochsalzlösungen eine erhöhte Anzahl voll- und teileluierter Zellen (Tab.11). Da sowohl die "Dehnung" in der hypotonen als auch die "Schrumpfung" in der hypertonen Lösung in gleicher Weise zu erhöhten Werten an voll- und teileluierten Zellen führt, dürften Membranveränderungen nicht die Ursache dafür sein.

Unterschiede in der Membrankomposition mögen für Eigenschaften in vivo und in vitro bedeutungsvoll sein. Ob sie bei luftgetrockneten und fixierten Zellen noch wirksam werden, ist sehr fraglich. Die These von SZELENY und HOLLAN (49), daß z.B. Harnstoff die Membran fetaler Erythrozyten weniger schädigt als die von Erythrozyten Erwachsener, berücksichtigt nicht, daß Harnstoff das Hämoglobin ebenfalls verändert und damit dessen Dissoziationsfähigkeit.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß die Membran wahrscheinlich nicht die Ursache der unterschiedlichen Eluierbarkeit von HbF und HbA ist.

2) Der Zellinhalt.

a) Die Innenstrukturen.

Innenstrukturen lassen sich lichtmikroskopisch nur in den Retikulozyten nachweisen, den jüngsten der normalerweise im Blut auftretenden Zellen der roten Reihe. Im Blut Erwachsener sind durchschnittlich 7-15‰ enthalten, bei Neugeborenen um 30-50‰. Werden junge Erythrozyten mit basischen Farbstoffen inkubiert, so treten Polychromasie und als Zeichen einer Koagulation netzförmige Strukturen und basophile Tüpfelung auf. Das Retikulum ist also ein Artefakt aus basophiler Substanz, das zum Teil als Ribonukleinsäure identifiziert wurde

(41, 5o). Das Retikulum zeigt aber eine stärkere Affinität zu den Farbstoffen der Oxazinreihe, wie z.B. Brilliantkresylblau und Nilblausulfat, während reine RNS die stärkere Reaktion mit Triphenylmethanfarbstoffen (Methylviolett) ergibt. Nilblausulfat färbt aber auch Fettsäuren und saure Lipide an, sodaß neben RNS ein Lipidanteil am Retikulum wahrscheinlich ist (13, 17, 41).

Eine Behinderung des Hämoglobinaustritts ist nur dann anzunehmen, wenn die durch die Farbstoffe koagulierte Substanz schon vor ihrer Ausfällung aus Zellstrukturen besteht, die das Innere der Erythrozyten durchziehen. Durch festere Bindung von Hämoglobin an diese Strukturen, an denen es auch synthetisiert wird, könnte eine weitere Retention bedingt sein. Während DUSTIN und KOSENOW (13,22) eine Bildung der basophilen Substanz auch ohne vorgebildete zytoplasmatische Struktur für möglich halten, bezeichnet SENO (41) das Retikulum als "Koagulat aus Residuen der Zytoplasmafibrillen, aus RNS, Lipoiden, Atmungsfermenten, Calcium oder Magnesium und Faserproteinen".

In den eigenen Untersuchungen ergaben sich bei retikulozytenreichem Blut (Nabelschnurblut) zwischen Normalausstrichen und Ausstrichen, bei denen das Blut vorher mit Brilliantkresylblau inkubiert worden war, deutliche Elutionsunterschiede (Tab. 4 und 5). Daß die Vermehrung voll eluierter Zellen wirklich auf Kosten junger Zellen geht, wird durch Schichtungsversuche noch verdeutlicht. So zeigen Präparate aus den obersten Schichten von scharf zentrifugiertem Nabelschnurblut - in denen sich die jungen Zellen besonders anreichern - im Gegensatz zu den unteren Schichten - wohin die älteren Zellen vorwiegend absedimentiert werden - eine deutlich höhere Zahl voll eluierter Zellen (Tab.7 Abb. 2 und 3). Dies beruht auf dem höheren HbA-Gehalt jüngerer, d.h. kurz vor der Geburt gebildeter Erythrozyten.
Nach Brilliantkresylblauinkubation nimmt aber die Zahl voll eluierter Zellen gerade in den oberen retikulozytenreichen Schichten weiter zu, wo durch den Farbstoff die Substantia granulofilamentosa ausgefällt wurde. Dieser weitere Zuwachs liegt aber niedriger als die Retikulozytenzahl der Blutprobe, da ja ein Teil der Retikulozyten HbF enthält (Tab.7). So ist wohl die

Substantia granulofilamentosa für die Hämoglobinretention verantwortlich zu machen, auf der die Differenz vor und nach Inkubation beruht. Retikulozyten können also HbF-haltige Zellen vortäuschen. Eine ähnliche Zunahme voll eluierter Zellen ergibt sich im Prinzip auch bei Erwachsenenblut, deutlich allerdings erst bei etwas höheren pH-Werten, wo HbA nicht mehr so leich diffusibel ist (Tab.7).

Diese Ergebnisse stützen die These, daß eine cytoplasmatisch vorgebildete Struktur Teil der basophilen Koagulate ist, die bei der Elution Hämoglobin zurückzuhalten vermögen.

Zum Vergleich wurde Blut noch mit den basischen Farbstoffen Acridinorange, Nilblausulfat, Brilliantkresylblau und Methylviolett inkubiert, wobei sich keine einheitlichen Ergebnisse zeigten (Tab.8). Die Zahl voll eluierter Zellen ist bei Nilblausulfat und Acridinorange am höchsten, kleiner bei Brilliantkresylblau und am niedrigsten bei Methylviolett, das auch als Triphenylmethanfarbstoff keine Retikulozytendarstellung macht. Beim Vergleich der Retikulozytenzahlen, die nach Inkubation mit den drei Farbstoffen ausgezählt werden können, finden sich auffallenderweise bei Nilblausulfat und Acridinorange nur etwa halb so viele Retikulozyten wie bei Brilliantkresylblau, obwohl sie in den gefärbten Ausstrichen mehr voll eluierte Zellen erzeugen als dieses (Tab.9). Neben der verminderten Retention durch die basophile koagulierte Substanz müssen also noch andere Faktoren im Spiele sein. JUNG (21) beschreibt bei längerer Einwirkung von Brilliantkresylblau und Nilblausulfat Membranveränderungen und Lyse, die hier wohl auszuschließen ist, da nur 20 Minuten inkubiert wurde. Nach Inkubation mit dem Fluorochrom Acridinorange konnte bei den vorliegenden Untersuchungen dagegen immer eine geringe Agglutination der Erythrozyten beobachtet werden.

Den eigenen Versuchen zufolge eignet sich also Brilliantkresylblau am besten, weil es die basophile Substanz am optimalsten ausfällt, die nach den vorliegenden Untersuchungen für eine Retention von Hämoglobin in Frage kommt. Es führt damit zu einer Verbesserung der Objektträgermethode, besonders bei retikulozytenreichem Nabelschnurblut.

b) Das Hämoglobin.

Neben Membran und Innenstrukturen der roten Blutzellen kommt als weiterer Faktor für die Unterschiede der Elution das Hämoglobin in Frage.

Normale Erythrozytenpopulationen enthalten Hämoglobin in verschiedenen Zustandsformen, als Oxy-Hb, reduziertes Hb, CO-Hb und Met-Hb. Da diese Zustandsformen durch Wechsel der Bindungspartner am Eisenmolekül oder durch dessen Oxydation zustande kommen, könnten solche Veränderungen des Hämmoleküls die Elutionsfähigkeit des Hämoglobins beeinflussen.
Die zwei physiologischen Zustandsformen des Hämoglobins sind Oxy-Hb und reduziertes Hb. Wird das O_2-Molekül durch CO ersetzt, so bildet sich ein stabiler kirschroter Komplex, der nur sehr langsam zerfällt. Er neigt weniger zu Oxydation und Denaturierung wie Oxy-Hb. Im Met-Hb liegt das Eisenatom in dreiwertiger Form vor und reagiert weder mit O_2 noch mit CO. Interessanterweise geht dem Met-Hb des fetalen Hämoglobins auch die Alkalistabilität verloren (1). Mit CN-Ionen bildet es den äußerst stabilen CN-Met-Hb-Komplex, der zur Konzentrationsbestimmung von Hämoglobinlösungen verwandt wird.

Trotz dieses unterschiedlichen Verhaltens durch Veränderungen am Hämmolekül findet sich bei der Elution von in dieser Weise verändertem Hämoglobin keine klaren Unterschiede der voll- und teileluierten Zellen (Tab.13). Die Ergebnisse erlauben den Schluß, daß Oxydation des Eisens und Variation seiner Bindungspartner als isolierte Zustandsänderung des Häms für die Elution ohne Bedeutung sind. Dies kann damit erklärt werden, daß alle Zustandsformen des Hämoglobins durch Alkoholfixation wahrscheinlich in eine einheitliche Form überführt werden. Dafür sprechen zumindest Spektralkurven von Oxy-, Met- und CN-Met-Hb in Erythrozyten auf dem Objektträger, die sich nach Lufttrocknung noch unterscheiden, während sie nach Alkoholfixation in eine spektral einheitliche Form übergehen (25).

Allen Säugerhämoglobinen sind vier Polypeptidketten gemeinsam, die durch nicht kovalente Bindungen zusammengehalten werden, worauf ihre Eigenschaft beruht, schon bei geringen Milieuveränderungen verschiedener Art in niedermolekulare Untereinheiten zu dissozieren. Am deutlichsten ist die Dissoziation bei pH-Werten unter 3,5, wo das Hämoglobin aber schon denaturiert ist.

Bei stärkerer Denaturierung, wie sie durch bestimmte Alkohole oder Detergentien eintritt, findet sich eine noch ausgesprochenere Dissoziation (4o). Für Pferdehämoglobin fanden REICHMAN et al. (36) Dissoziation in Halbmoleküle zwischen pH 4 und 3,7, darunter in Viertelmoleküle. Die unterschiedliche Dissoziation von HbA und HbF bei Einwirkung von Parachlormercuribenzoat (PCMB) ist in jüngster Zeit von ROSEMEYER und HUEHNS (39) untersucht worden.
Während HbA beipH 6 und PCMB im Überschuß vollständig in Monomere dissoziiert, finden sich bei HbF unter diesen Bedingungen nur Dimere. Monomere bilden sich erst bei niedrigeren pH-Werten nach mehrtägiger Einwirkungszeit. Als Ursache erkannten sie die größere Zahl von Sulfhydrylgruppen der β-Kette des HbA gegenüber der γ-Kette des HbF, die für die Reaktion mit PCMB verantwortlich sind.

Es liegt nahe, die folgenden Versuchsergebnisse mit den angeführten Eigenschaften des Hämoglobins zu verknüpfen.

In Objektträgerversuchen bei Puffer-pH-Werten zwischen pH 3,2 und 3,5 (Tab. 4, 5 und 7) und in Modellversuchen durch Papierelution zwischen pH 2,8 und 3,6 (Abb. 5-7) zeigt sich, daß mit sinkender Wasserstoffionenkonzentration das Elutionsausmaß zunimmt. Auf dem Objektträger beginnt die Elution etwa bei pH 3,5. Sie ist für Nabelschnurblut vollständig bei pH 2,6, für Erwachsenenblut schon bei pH 3,2 abgeschlossen. Die Filterpapierelution zeigt grundsätzlich die gleichen Ergebnisse. Hier werden die quantitativen Verhältnisse aber deutlicher. Die eluierte HbA-Menge ist hier zwischen pH 3,6 und 3,2 etwa doppelt so hoch wie die entsprechende von HbF. Dies entspricht auch einer stärkeren Zunahme voll eluierter Zellen bei Erwachsenenblut in diesem pH-Bereich gegenüber Nabelschnurblut in Ausstrichpräparaten (Tab.7, Abb. 6 und 7).

Neben der sich lösenden Menge finden sich auch Unterschiede in der Lösungsgeschwindigkeit. Sie ist größer bei HbA und steigert sich bei beiden Hämoglobintypen mit sinkendem pH, parallel zu der sich lösenden Menge. Mit steigender Konzentration in der Elutionslösung nimmt sie wieder ab. Bei einem Ausstrich von Erwachsenenblut ist die Elution bei pH 3,2 schon nach einer Minute abgeschlossen, während HbF nach spektralphotometrischen Unter-

suchungen einzelner Erythrozyten als gesamter Farbstoff erhalten bleibt (25). In eigenen Versuchen zeigte sich jedoch bei längerer Elutionsdauer eine weitere Zunahme voll und teileluierter Zellen bei NS-Blut (Tab.6), die demnach nur durch eluiertes HbF zustande kommen können, wenn man nicht eine Retention des HbA durch HbF diskutieren will. Wie Löslichkeitsversuche zeigen, erreicht HbF eine Sättigungskonzentration im Puffer von pH 3,2 bei etwa 0,6 g%, sodaß eine Elution von HbF aufgrund seiner Löslichkeitseigenschaften als sicher anzunehmen ist (Abb.8).
Erhöhung der Alkoholkonzentration über 80% verstärkt die anfängliche Elutionsgeschwindigkeit und die eluierte Hämoglobinmenge. So wird z.B. Hämoglobin aus Nabelschnurerythrozyten nach Fixation mit 88%-igem Äthanol schon bei pH 3,2 innerhalb der üblichen Elutionszeit vollständig eluiert (Tab.2b). Deutlicher werden die Zunahme der Elutionsgeschwindigkeit und der eluierten Menge bei der Filterpapierelution, bei der die Vorgänge insgesamt verzögert ablaufen (Abb.5).

Der Einfluß der Temperatur ist sehr gering. KLEIHAUER fand etwa zwischen 37 und 20°C Puffertemperatur gleichstarke Elution, während sich unter 20°C auch HbA-haltige Zellen anfärben (24). Durch Filterpapierelution konnte in eigenen Versuchen der geringe Temperatureinfluß auf die Elution bestätigt und als Eigenschaft des Hämoglobins bestimmt werden (Tab.14).

Diesen Ergebnissen zufolge scheint die Elution ein Problem der unterschiedlichen Dissoziation zu sein, und zwar der leichteren Dissoziation von HbA in Pufferlösungen zwischen pH 3,2 bis 3,3, die zur Elution bei der routinemäßigen Methode verwandt werden. Bestätigt wird dies durch vergleichende Löslichkeitsversuche von getrocknetem und pulverisiertem Erwachsenen- und Nabelschnurblut bei pH 3,2, wobei sich eine etwa 7 mal größere Menge an gelöstem HbA ergibt (Abb.8).

Es gibt noch einige weitere Beispiele, die für das Hämoglobin als Ursache der unterschiedlichen Eluierbarkeit sprechen:

1) Bei der hereditären Persistenz von HbF wird fetales Hämoglobin mit der Elutionsmethode in allen Erythrozyten dargestellt (11). Obwohl es sich um normale Erythrozytenmembranen Er-

wachsener handelt, wird HbF nicht herausgelöst.

2) Mit gewissem Vorbehalt kann die Thalassämia major hier angeführt werden. Man findet in einem großen Teil der Erythrozyten fetales Hämoglobin. Hier könnten jedoch gleichzeitig vorkommende pathologische Membraneigenschaften eine Rolle spielen.

3) Das Phänomen der "reversiblen Hämolyse" besagt, daß vollständig hämolysierte Erythrozyten imstande sind, erneut Hämoglobin in den Zelleib aufzunehmen und festzuhalten, wenn die Isotonie wieder hergestellt wird. Auf diese Weise lässt sich HbF in Erwachsenenmembranen und HbA in Membranen von Nabelschnurerythrozyten einbringen. Bei der Elution solcher Erythrozyten wird HbA aus revertierten Nabelschnurerythrozyten herausgelöst, umgekehrt bleibt HbF in entsprechend behandelten Erwachsenenerythrozyten.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die Frage, welche Bedeutung Strukturelemente des Erythrozyten und Hämoglobin bei der Elutionsmethode haben, war Anlaß zu den vorliegenden Untersuchungen. Dabei wurden nach einer Analyse der einzelnen Teilschritte der Methode die Eigenschaften der Zellstrukturen (Membran und Innenstruktur) und des Hämoglobins unter anderen Bedingungen - teilweise in Modellversuchen - untersucht.

Aus den Ergebnissen wurden folgende Schlüsse gezogen:

1) Die Bedeutung der denaturierten Membran für die Elution besteht hauptsächlich darin, daß ihre ausreichende Fixation rein morphologisch Voraussetzung einer klaren Beurteilung der Präparate ist. Für den Elutionsvorgang selbst scheint ihre Funktion rein statischer Natur zu sein, da sich durch vorhergehende experimentelle Strukturänderungen der Erythrozytenoberfläche am Verhältnis der eluierten HbF- und HbA-Mengen nichts ändert. Stellt man sich die Oberfläche des fixierten Erythrozyten als Netzwerk aus koagulierten Zellbestandteilen vor, so lässt sich fehlende Eluierbarkeit durch Retention undissoziierter Hämoglobinmoleküle durch fixierte Strukturelemente erklären, während dissoziierte Hämoglobinuntereinheiten durch die "Maschen" in die Elutionslösung diffundieren können.

2) Retikulozyten enthalten in vivo eine Innenstruktur, die auch nach Lufttrocknung und Alkoholfixation noch imstande ist, Hämoglobin im Erythrozyten festzuhalten. Bei den Nabelschnurretikulozyten wird dies schon im pH-Bereich des bei der Methode verwendeten Puffers deutlich, während Retikulozyten aus Erwachsenenblut erst von höheren pH-Werten an eine deutliche Retention zeigen. Eine Verbesserung des Elutionsergebnisses durch Inkubation des Blutes mit basischen Farbstoffen vor Anfertigen der Ausstriche ist deshalb nur bei retikulozytenreichem Säuglings- und Nabelschnurblut zu erwarten. Als Vitalfarbstoff eignet sich nach den eigenen Versuchen Brilliantkresylblau am besten, weil der Zuwachs an voll eluierten Zellen der ausgezählten Retikulozytenzahl dabei am nächsten kommt.

3) Die unterschiedliche Eluierbarkeit beruht sehr wahrscheinlich auf der Fähigkeit des HbA, leichter als HbF in seine Untereinheiten zu dissoziieren. Diese Fähigkeit nimmt bei sinkendem pH-Wert für beide Hämoglobintypen zu, was sich in einer Zunahme der eluierten Hämoglobinmenge und der Elutionsgeschwindigkeit äußert. Ausschlaggebend ist der quantitative Unterschied bei den Bedingungen der Elutionsmethode. Zusätzliche Denaturierungsmaßnahmen zeigen in Blutausstrichen wie auch bei isolierter Untersuchung von Hämolysaten gleiche Ergebnisse: Höher prozentiger Alkohol erhöht, verlängerte Lufttrocknungszeit und Puffertemperaturen unter 20°C vermindern die eluierbare Hämoglobinmenge und die Elutionsgeschwindigkeit. Weitere Indizien für die zentrale Stellung des Hämoglobins beim Mechanismus der Elutionsmethode sind das Verhalten des HbF bei der hereditären Persistenz von HbF, der Thalassämia major und der "Reversion der Hämolyse".

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Betke, K.: Der menschliche rote Blutfarbstoff bei Fetus und reifem Organismus. Springer, Berlin 1954

2. Betke, K.: Fetales Hämoglobin und fetale Erythrozyten. 2. Symposion über Funktion und Struktur der roten Blutzellen. Berlin 1957

3. Betke, K. und E. Kleihauer: Fetaler und bleibender Blutfarbstoff in Erythrozyten und Erythroblasten von menschlichen Feten und Neugeborenen. Blut 4, 241 (1958)

4. Betke, K. und J. Greinacher: Hitzedenaturierung und Hitzekoagulation bei fetalem und bleibendem Hämoglobin des Menschen. Z. Kinderhk. 75, 235 (1964)

5. Betke, K., J.Greinacher und F. Hecker: Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch Kaliumferricyanid. Arch.exper.Path. u. Pharmakol. 229, 207 (1956 a)

6. Betke, K., J. Greinacher und O. Tietze: Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch Natriumnitrit. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 229, 220 (1956 b)

7. Betke, K. und W. Savelsberg: Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämiglobin. Bioch. Z. 320, 431 (1950)

8. Bischoff, H.: Untersuchungen über die Resistenz des Hämoglobins des Menschenblutes mit besonderer Berücksichtigung des Säuglingalters. Z. exper. Med. 48, 472 (1926)

9. Brauitzer, G. und V. Rudloff: Die Hämoglobine. Dtsch. med. Wschr. 18, 959 (1962)

10. Brinkmann, R.A. und J.H.P. Jonxis: The occurence of several kinds of hemoglobin in humal blood. J. Physiol. 85, 117 (1935)

11. Conley, C.L., D.J. Weatherall, S.N. Richardson, M.K. Shepard and S. Charache: Hereditary persistence of fetal hemoglobin: A study of 79 affected person in 15 negro families in Baltimore.
Blood 21, 261 (1963)

12. Crowley, J., P. Ways and J.W. Jones:
Human fetal erythrocyte and plasma lipids.
J. Clin. Invest. 44, 989 (1965)

13. Dustin, P.: Contribution à l'étude histophysiologique et histochimique des globules songes de vértébres
Arch. de. Biol. 55, 285 (1944)

14. Drabkin, D.L. and I.H. Austin: Spektrophotometric Studies II
J. Biol. Chem. 112, 105 (1935-36)

15. Gabl, F. Supravitalfärbung.
Handbuch der gesamten Hämatologie Bd. 2, 101 (1060)

16. Goldsmith, K.: Papain-treated red cells in the detection of incomplete antibodies.
Lancet 1, 76 (1955)

17. Harms, H.: Handbuch der Farbstoffe für die Miktroskopie.
Stauffen-Verlag 1965

18. Hill, R.J., W. Königsberg, G. Guidotti and L.C. Craig:
The structure of human hemoglobin. 1. The separation of the alpha- and beta-chains and their amino acid composition.
J. Biol. chem. 237, 1549 (1962)

19. Huisman, T.H.I.: Normal and abnormal human hemoglobins.
In Advances in clinical Chemistry 6, 231 (1963)

2o. Jope, E.M.: The ultraviolet spectral absorbtion of hemoglobins inside and outside the red blood cell.
"Hemoglobin" Symposion London Butterworth's
Sei. publ. 1949

21. Jung, F.: Zur Pathologie der roten Blutkörperchen.
Klin. Wschr. 21, 917 (1942)

22. Kosenow, W.: Die Vitalfluorochromierung der Retikulozyten mit Acridinorange.
Fol. haemat. 71, 170 (1953)

23. Kleihauer, E.: Denaturierung von fetalem und bleibendem Hämoglobin durch Salzsäure.
Naturwissenschaften 44, 308 (1957)

24. Kleihauer, E.: Blutausstrich.
In "Blutbildung und Blutumsatz bei Feten und Neugeborenen."
Enke-Verlag Stuttgart 79 (1962)

25. Kleihauer, E.: Fetales Hämoglobin und fetale Erythrozyten
Enke-Verlag Stuttgart 1966

26. Kleihauer, E. und K. Betke: Praktische Anwendung des Nachweises von HbF-Zellen in fixierten Blutausstrichen.
Internist. 1, 292 (1960)

27. Kleihauer, E., H. Braun und K. Betke: Demonstration von fetalem Hb in den Erythrozyten eines Blutausstriches.
Klin.Wschr. 35, 637 (1957)

28. Lecks, H.J.: Methemoglobinemia in infancy.
Am. J. Dis. Child 79, 117 (1950)

29. Lindemann, B.: Dissoziationstheorie der osmotischen Hämolyse. (Über die osmotische Hämolyse als Strukturproblem). Naunyn-Schmiedebergs Archiv für exp. Path. und Pharmakologie 206, 197 (1949 a)

30. Lindemann, B.: Zur Feinstruktur der Erythrozytenmembran.
Naunyn-Schmiedebergs Archiv für exp. Path. und Pharmakologie 206, 439 (1949 b)

31. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and R.I. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

32. Matthes, M.: Resistenzbestimmungen.
Handbuch der gesamten Hämatologie Bd 2, 131 (1060)

33. Mohring, D.: Normale und pathologische Reaktionen der Erythrozytenmembran.
Blut 9, 481 (1963)

34. Ponder, E.: The cell membrane and its properties.
The Cell, Acad. Press. 1961

35. Probst, H.: DNS, RNS und Proteinsynthese sowie NAD-Gehalt in Asciteskrebszellen nach Einwirkung tumorhemmender Substanzen.
Diplomarbeit 1966, Tübingen

36. Reichman, M.E. and J.R. Colvin: The number of subunits in the molecule of horse hemoglobine.
Can.J.Chem. 34, 411 (1956)

37. Rhinesmith, H.S., W.A. Schroeder and L. Pauling:
The number and bind of polypeptide chains in normal adult human hemoglobin.
J. Americ. chem. Soc. 79, 4682 (1957)

38. Roche, I. et Y. Derrien: Les hémoglobines humaines et les modifications physiologiques de leurs charactères.
Sang 24, 97 (1953)

39. Rosenmeyer, M.A. and E.R. Huehns: On the mechanism of the dissociation of hemoglobin.
J. Mol. Biol. 25, 253 (1967)

40. Rossi Fanelli, A., E. Antonini und A. Caputo:
Hemoglobin and myoglobin.
Advances in Protein Chemistry
Acad. Press Bd. 19, 74 (1964)

41. Seno, S.: Die Struktur der Retikulozyten.
Hd.Buch der gesamten Hämatologie Bd. 1, 229 (1957)

42. Singer, K., A.J. Chernoff and L. Singer:
Studies on abnormal hemoglobins
1. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation.
Blood 6, 413 (1951)
2. Their identification by means of the method of functional denaturation.
Blood 6, 429 (1951)

43. Schenk, E.G. : Untersuchungen über das Globin bei Tieren, gesunden und kranken Menschen.
Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 150, 160 (1930)

44. Schroeder, W.A., J.R. Shelton, J.B. Shelton and J. Cormick: Further sequences in the gamma-chain of human fetal hemoglobin.
Proc. nat. Acad. Sci. 48, 284 (1962)

45. Schroeder W.A., J.T. Cua, G. Matsuda and W.D. Fenninger: Hemoglobin F_1, an acetyl-containing hemoglobin.
Biochem. Biophys. Acta 63, 532 (1962)

46. Schubothe, H.: Wärmeveränderung roter Blutkörperchen.
Schw.Med. Wschr. 83, 1048 (1953)

47. Shepard, M.K., D.J. Weatherall and C.L. Conley: Semiquantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations.
Bull. Johns. Hopk. Hosp. 110, 293 (1962)

48. Steenblock, U.: Untersuchungen über Hämoglobingehalt und Hämoglobinkonzentration in Erythrozyten nach Differentialzentrifugation.
Dissertation Tübingen 1967

49. Szelény, J.G. and S.R. Hollán: A new method for the cytological differentiation of foetal and adult erythrozytes.
Vox. Sang. 12, 234 (1967)

50. Thoma, K.: Über den Nachweis von Ribonukleinsäuren in Erythrozyten.
Klin. Wschr. 28, 215 (1950)

51. Troschin, A.S. : Das Problem der Zellpermeabilität.
Fischer Jena 1958

52. Uhlenbruck, G.: Das Studium der Zelloberfläche mit Hilfe von Enzymen.
Mitteil. Max-Plank-Gesellschaft 4, 227 (1965)

53. Uhlenbruck, G. und Z. Kim: Abhängigkeit serologischer Reaktionen von der Oberflächenstruktur der Erythrozyten.
Biotest-Mitteil. 23, 33 (1966)

Lebenslauf

Ich, Hansmartin Killguss, wurde am 3. Oktober 1943 als Sohn des Oberlehrers Alfred Killguss in Freudenstadt geboren.

Vom Herbst 1949 bis Frühjahr 1953 besuchte ich in Aach die Grundschule. Die ersten vier Jahre meiner Gymnasialzeit war ich am Progymnasium Dornstetten und wechselte dann zum Keplergymnasium Freudenstadt über, an dem ich 1962 mit dem Abitur abschloß.

Mein Medizinstudium begann ich im SS 1962 in Tübingen. Nach bestandener naturwissenschaftlicher und ärztlicher Vorprüfung in Tübingen studierte ich im WS 1964/65 und im SS 1965 in Hamburg. Zum WS 1965/66 kehrte ich wieder nach Tübingen zurück, wo ich vom 1. 10. 67 bis 19. 2. 68 das Staatsexamen abgelegt habe.

BAMBERGER FOTODRUCK · RUDOLF RODENBUSCH
8600 BAMBERG - Markusplatz 22 - Tel.: 0951/6 27 94